

P1342



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 02 392 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
A 61 K 38/05
A 61 K 38/55

②1 Aktenzeichen: 101 02 392.8
②2 Anmeldetag: 19. 1. 2001
④3 Offenlegungstag: 14. 8. 2002

(1)

DE 101 02 392 A 1

⑦1 **Anmelder:**

Institut für Medizintechnologie Magdeburg GmbH,
39120 Magdeburg, DE; Ansorge, Siegfried, Prof.
Dr., 39291 Hohenwarthe, DE

⑦4 **Vertreter:**

Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München

⑦2 **Erfinder:**

Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe,
DE; Lendeckel, Uwe, Dr., 39120 Magdeburg, DE;
Neubert, Klaus, Prof. Dr., 06120 Halle, DE; Reinhold,
Dirk, Dr., 39120 Magdeburg, DE

⑤6 **Entgegenhaltungen:**

Schön E. [u.a.]: The role of dipeptidylpeptidase
IV in human Thymphocyte activation. Inhibitors
and
antibodies against dipeptidyl peptidase IV
suppress lymphocyte proliferation and
immunoglobu-
lin synthesis in vitro. In: Eur. J. Immunol.,
1987, Vol. 17, S. 1821-26;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Kombinierte Verwendung von Enzyminhibitoren und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie und Prävention allergischer Reaktionen vom Typ I nach Gell und Coombs

⑤7 Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Hemmung der für die Proliferation notwendigen DNA-Synthese und der IL-4-Produktion von Immunzellen, insbesondere von T_H2 -Lymphozyten, durch die gleichzeitige und gemeinsame Wirkung von Inhibitoren der Alanyl-Amino-peptidase und Dipeptidylpeptidase IV.

Die DNA-Synthese (Proliferation) und IL-4-Produktion mononukleärer Zellen wird in einem Ausmaß gehemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNA-Synthese (Proliferation) und IL-4-Produktion von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren nicht vollständig und nicht dauerhaft. Aus der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive/superadditive Hemmwirkung auf die DNA-Synthese und IL-4-Produktion.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und Prävention von allergischen Reaktionen vom Typ I nach Gell und Coombs die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

DE 101 02 392 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung beschreibt die Hemmung der für die Proliferation notwendigen DNA-Synthese und der Zytokinproduktion (Interleukin-4, IL-4) von T_H2 -Zellen durch die kombinierte Wirkung von Inhibitoren der Aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2, CD13), und der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26) im Ergebnis der simultanen Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Aktivierung, die Proliferation (DNA-Synthese) und Zytokinproduktion (IL-4) von T_H2 -Zellen supprimiert wird.

[0002] Für alle allergischen Reaktionen vom Typ I wie Asthma bronchiale oder Heuschnupfen gilt, dass eine Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion (besonders IL-4) von Immunzellen, insbesondere von T_H2 -Zellen, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen [D. D. Corry et al.: Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402: B18-B23]. Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. *Immunology Today* 1994; 15: 180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 4: 17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999; 20: 83-88]. Verschiedene Funktionen Mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNA-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV oder der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 17-27].

[0003] Auf der anderen Seite haben wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre die allergische Reaktion vom Typ I als eine Erkrankung charakterisiert, bei der den T_H2 -Lymphozyten eine entscheidende Rolle für die Entstehung und Chronifizierung der Erkrankung zukommt [D. D. Corry et al.: Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402: B18-B23. P. J. Barnes: Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature* 1999; 402: B31-B38].

[0004] IL-4 stellt einen Helferzytokin der B-Zell-Proliferation dar, stimuliert die Bildung von IgE und die Expression niedrigaffiner Fc-IgE-Rezeptoren. Darüber hinaus verstärkt IL-4 die Induktion von T_H2 -Zellen selbst und kontrolliert die Proliferation und Aktivität von Eosinophilen und Mastzellen. Damit spielt es eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen vom Typ I [D. P. Stites, A. I. Terr, T. G. Parslow: *Medical Immunology*. Appelton & Lange, Stamford, CT, 1997].

[0005] Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N, die Proliferation (DNA-Synthese) und IL-4-Produktion mitogenstimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich die gleichen Prozesse, nämlich die DNA-Synthese und damit die Proliferation sowie die IL-4-Produktion der T_H2 -Zellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine superadditive Hemmwirkung auf DNA-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung beider Enzyme.

[0006] Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie allergischer Reaktionen vom Typ I für deren Entstehung die Proliferation und die Aktivierung von T-Lymphozyten eine zentrale Bedeutung hat, die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der DP IV und der APN bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

[0007] Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNA-Synthese und die IL-4-Produktion von MNZ durch die simultane Administration von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N in superadditiver Weise inhibiert wird.

[0008] Die Applikation von Enzyminhibitoren stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar.

[0009] Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide ($n = 0-10$), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein α -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N⁶-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD 296 075 A5). Bevorzugte Inhibitoren für die Alanyl-Aminopeptidase sind Bestatin (Ubenimex), Actinonin, Probestin, Phebestin, RB3014 oder Leuhistin.

[0010] Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instillativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, in-

transkulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

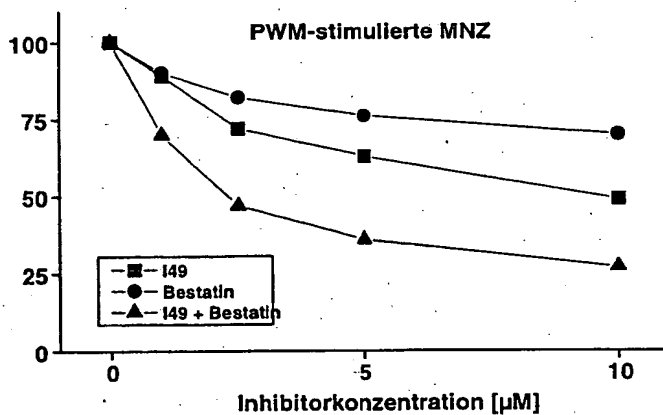
Inhibierung der DNA-Synthese Pokeweed-Mitogen (PWM)-stimulierter humaner mononukleärer Zellen (MNZ) des peripheren Blutes durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

[0011] Unsere Untersuchungen zeigen, dass die DNA-Synthese Pokeweed-Mitogen-stimulierter humaner MNZ des peripheren Blutes durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und APN (Bestatin) in additiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart von Pokeweed-Mitogen und der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNA-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase N induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 1 zeigt die dosisabhängige, additive Hemmung der DNA-Synthese.

Abb. 1

Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Bestatin) auf die DNA-Synthese humaner PWM-stimulierter MNZ

% DNA-Synthese



[0012] Humane periphere MNZ wurden über drei Tage mit PWM (2 µg/ml) und den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNA eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

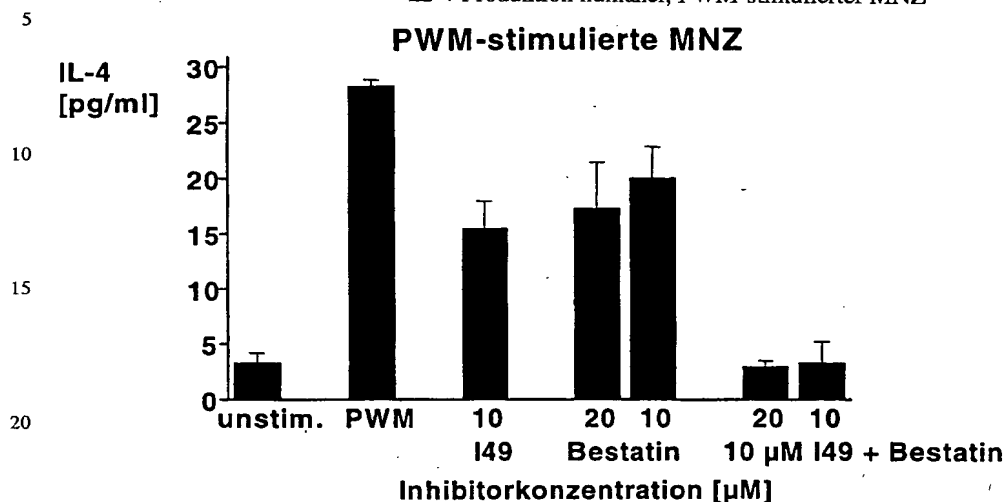
Beispiel 2

Inhibierung der IL-4-Produktion Pokeweed-Mitogen-stimulierter humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

[0013] Unsere Untersuchungen zeigen den interessanten Befund, dass die Produktion des für THZ-Zellen charakteristischen Zytokins IL-4 von Pokeweed-Mitogen-stimulierten humanen mononukleären Zellen (MNZ) des peripheren Blutes durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und der APN (Bestatin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 48 h in Gegenwart von Pokeweed-Mitogen und der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend mittels kommerzieller IL-4-Bestimmungs-Kits (ELISA) die Konzentrationen des IL-4 in den entsprechenden Kulturüberständen bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 2 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der IL-4-Produktion.

Abb. 2

Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP N (I49) und der Aminopeptidase N (Bestatin) auf die IL-4-Produktion humaner, PWM-stimulierter MNZ



[0014] Humane periphere MNZ wurden über 48 h mit PWM (2 $\mu\text{g/ml}$) und den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden mittels IL-4-ELISA die Konzentrationen von IL-4 in den entsprechenden Kulturüberständen gemessen.

Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur additiven bzw. synergistischen Hemmung von Aktivierung, Proliferation (DNA-Synthese) und Produktion von Th_2 -Zytokinen humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z. B. Proboro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (Xaa = α -Aminosäure, n = 0–10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Aminosäureamide, z. B. N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothirole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe-y[PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze fungieren.
5. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von allergischen Reaktionen vom Typ I.
6. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzyme gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.
7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (Xaa = α -Aminosäuren, n = 0–10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z. B. N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.
9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6 umfassend als Inhibitoren der APN vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothirole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe-y[PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze.
10. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität in räumlich getrennt-

ter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.

11. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 6 bis 10 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.

12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 10 für die topische Anwendung in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen-/Vehikeln, einschließlich instilativer Applikation.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -